

(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. August 2003 (28.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/070735 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07F 9/6506**, C07K 5/062, 5/078, 5/09, C07C 229/16, C07D 233/64, A61K 9/127, C12N 15/88

(74) Anwälte: SCHNEIDER, Henry usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstrasse 15-17, 10117 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/01662

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, GD, GE, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, RO, SC, SG, TN, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA.

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Februar 2003 (19.02.2003)

Deutsch

(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität:
102 07 178.0 19. Februar 2002 (19.02.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, Ug, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NOVOSOM AG [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindeverklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/070735 A2

(54) Title: COMPONENTS FOR PRODUCING AMPHOTERIC LIPOSOMES

(54) Bezeichnung: KOMPONENTEN FÜR DIE HERSTELLUNG AMPHOTERER LIPOSOMEN

(57) Abstract: The invention relates to amphoteric lipids. According to the invention, at least one amphoteric group having an isoelectric point between 4 and 9 is substituted on a membranous or membrane-forming amphiphile. The invention also relates to liposomes containing said compounds.

(57) Zusammenfassung: Es werden amphotere Lipide vorgeschlagen, wobei an ein membranständiges oder membranbildendes Amphiphil eine oder mehrere amphotere Gruppen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 9 substituiert sind sowie Liposomen, die diese Verbindungen enthalten.

5

Komponenten für die Herstellung amphoterer Liposomen

Die Erfindung betrifft amphoter Verbindungen auf Basis amphiphiler Moleküle, wobei an deren Kopfgruppen eine oder mehrere amphoter Gruppen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 9 substituiert sind, Liposomen, die diese Verbindungen enthalten sowie ihre Verwendung.

Unter dem Begriff der Lipide werden drei Klassen von Naturstoffen zusammengefasst, die sich aus biologischen Membranen isolieren lassen: Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterol mit seinen Derivaten. Technisch hergestellte Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften sind die Diacylglycerole oder N, N-Dialkylamine.

20

Von technischem Interesse sind diese Substanzen bei der Herstellung von Liposomen. Diese Liposomen lassen sich unter anderem als Container für Wirkstoffe bei pharmazeutischen Zubereitungen einsetzen. Wünschenswert ist dabei eine effiziente und stabile Verpackung des Cargos und eine kontrollierbare Freisetzung des Inhalts. Beide Ansprüche sind nicht ohne weiteres zu vereinen: Je stabiler und dichter die Verpackung ist, desto schwerer gibt sie den eingeschlossenen Wirkstoff wieder frei. Aus diesem Grund wurden Liposomen entwickelt, die ihre Eigenschaften als Reaktion auf einen äußeren Reiz verändern. Bekannt sind thermosensible und pH-sensitive Liposomen. Die pH-sensitiven Liposomen sind von besonderem Interesse, da dieser Parameter sich auch unter physiologischen Umständen, etwa bei der endozytotischen Aufnahme eines Liposoms in Zellen oder bei der Passage des Magen-Darm-Trakts, ändern kann.

Nach dem Stand der Technik umfassen pH-sensitive Liposomen insbesondere Cholesterolhemisuccinat (CHEMS). Cholesterolhemisuccinat wird in Mischung mit 5 Phosphatidylethanolamin zur Herstellung pH-sensitiver Liposomen verwendet (Tachibana et al.(1998); BBRC 251: 538-544, US4891208). Solche Liposomen können von Zellen endozytiert werden und vermögen auf diesem Weg Cargomoleküle in das Innere von Zellen zu transportieren, ohne die 10 Integrität der zellulären Membran zu verletzen.

Ein wesentlicher Nachteil des CHEMS ist dessen anionischer Charakter. Die damit hergestellten Liposomen besitzen eine negative Gesamtladung und werden nur mit geringer Effizienz 15 von Zellen aufgenommen. Trotz des oben beschriebenen Transfermechanismus eignen sie sich daher kaum für den Eintransport von Makromolekülen in Zellen. Außerdem ist es nicht möglich makromolekulare Wirkstoffe wie DNA in diesen Liposomen zu verpacken.

20 Für den Eintransport von Wirkstoffen in Zellen (Transfektion) werden fachgemäß kationische Liposomen verwendet, die über eine möglichst hohe und konstante Oberflächenladung verfügen. Die positive Gesamtladung solcher Partikel führt zu einer 25 elektrostatischen Anheftung an Zellen und in der Folge zu einem effizienten Eintransport. Der Einsatz dieser Verbindungen und der damit herstellten Liposomen bleibt aber auf Anwendungen *in vitro* oder *ex vivo* beschränkt, da solche positiv geladenen Liposomen mit Serumbestandteilen 30 unkontrollierte Aggregate bilden.

Der Stand der Technik beschreibt in der WO 00/59474 Verbindungen mit einem Membrananker und einer kationischen und

anionischen Kopfgruppe auf demselben Molekül, wobei die anionische Gruppe über eine Disulfidbrücke mit der Grundstruktur verbunden ist. Diese Disulfidbrücke kann unter physiologischen Bedingungen, etwa bei Kontakt mit dem Cytosol,
5 reduziert werden, die anionische Kopfgruppe wird dann freigesetzt und das Gesamt molekül erhält eine positive Ladung und ermöglicht die Fusion mit der Zellmembran. Nachteilhaft ist das Toxizitätsprofil und die Lagerstabilität der in WO
00/59474 offenbarten Verbindungen, da durch die Abspaltung der
10 Disulfidbrücken freie kationische Lipide entstehen. Für diese Verbindungen ist es bekannt, dass sie nachteilhafterweise eine zytotoxische Wirkung besitzen.

Weiterhin ist es bei den bekannten Lipiden und den sie
15 umfassenden Liposomen nachteilig, dass diese nur unterdurchschnittliche Mengen an Proteinen, DNA und / oder RNA binden bzw. einschließen können. Sofern Veränderungen der Liposomen dahingehend vorgenommen werden, dass diese mehr Mengen an Carbo binden bzw. einschließen können, werden diese
20 zytotoxisch oder weisen eine geringe Kompatibilität mit Serum oder Blut auf bzw. sind innerhalb des Blutes oder des Serums nicht stabil, da sie von einzelnen Bestandteilen des Blutes oder des Serums, wie beispielsweise Komplement oder Perforin, angegriffen werden. Die bekannten Liposomen und Lipide eignen
25 sich daher nur bedingt für den Einsatz im lebenden Organismus und weisen weiterhin nur eine geringe Effizienz bei dem Transport von Inhalts- und / oder Bindungsstoffen auf. Einzelne, bekannte Verbindungen, die zumindest einen Teil der genannten Nachteile nicht aufweisen, sind nur sehr kompliziert
30 herstellbar, wobei einzelne Komponenten so teuer sind, dass eine Verwertung im klinischen Maßstab bzw. bei der Verwendung in Laborroutinen nicht möglich ist.

Es bestand daher die Aufgabe, neue Verbindungen herzustellen,
35 die die genannten Nachteile nicht aufweisen und

- i) die es insbesondere ermöglichen, Wirkstoffe, insbesondere Plasmide in Liposomen einzuschließen,
 - 5 ii) aus denen Liposomen hergestellt werden können, die einen eingeschlossenen Wirkstoff in das Innere von Zellen transportieren können,
 - 10 iii) durch deren Anwesenheit die Herstellung von Liposomen möglich ist, die unter physiologischen Bedingungen mit Serum gemischt werden können, ohne dass es zur Aggregation kommt,
 - iv) die in hohem Anteil in liposomale Membranen eingebaut werden können und
 - v) die sich einfach und preiswert herstellen lassen.
- 15 Die Erfindung löst diese technische Aufgabe durch Liposomen, umfassend amphiphile Verbindungen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 und 8,5, die ihren Ladungszustand reversibel von kationisch nach anionisch in einem pH-Bereich von 1-2 Einheiten ändern können, nach der allgemeinen Formel
20 (I):

(I) Amphoteric - Y - Spacer - Amphiphil

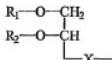
wobei

- 25 (a) der Amphoteric mindestens einen kationischen Ladungsteil mit einem pKa-Wert zwischen 4 bis 8 und/oder mindestens einen anionischen Ladungsteil mit einem pKa-Wert zwischen 3 bis 7 und gegebenenfalls weitere Ladungsträger umfasst, wobei
- 30 aa) der kationische Ladungsteil ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Imidazol, Morphinol,

Piperazin, Purin, Pyridin und/oder Pyrimidin oder ein Derivat hiervon,

- 5 bb) der anionische Ladungsteil eine Carboxylgruppe ist, die in der aliphatischen Kette gebundene Essigsäure, Bromessigsäure, Chloressigsäure, Acetoessigsäure, Propionsäure, Acrylsäure, Buttersäure, Crotonsäure oder Carbonsäuren umfasst, die einfach veresterte oder amidierte oder in der aliphatischen Kette gebundene Dicarbonsäure wie Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Caprylsäure, Pimelinsäure, Suberinsäure, Cyclohexandicarbonsäure oder auch Cyclopentandicarbonsäure umfasst; die einfach veresterte oder amidierte oder im aliphatischen Teil gebundene Oligocarbonsäure wie Citronensäure, Isocitronensäure oder Ethylenendiamintetraessigsäure umfasst,
- 10 (b) der **Spacer** ein Niederalkylrest mit bis zu 8 C-Atomen mit linearer, verzweigter oder ringförmiger Struktur mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen und 0-4 Hydroxylgruppen ist,
- 15 (c) Y - (C=O) -O- ; - (C=O) -NH- ; - NH-(C=O) -O- ; - O- ; - NH- ; - CH=N- ; - O-(O=C)- ; - S- ; (O=C)- ; - NH-(O=C)- ; - O-(O=C)-NH- , -N=CH- und/oder -S-S- umfasst.
- 20 (d) das Amphiphil eine Struktur nach der allgemeinen Formel (II) oder (III) oder (IV) ist:

(II)



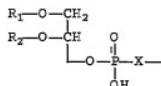
wobei

R₁ und R₂ unabhängig voneinander C₈ bis C₃₀ Alkyl oder Acylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und

5 X ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend -O-(C=O); -NH-(C=O)-; -S-(C=O)-; -O-; -NH-; -S-; -N=CH-; -(O=C)-O-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -N=CH- und/oder -S-S-;

oder

(III)



wobei

R₁ und R₂ unabhängig voneinander C₈ bis C₃₀ Acylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und

15 X -O- ist.

oder

(IV)



wobei

20 R₁ und R₂ unabhängig voneinander C₈ bis C₃₀ Alkylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und

X abwesend oder ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus -(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; -(C=O)-S-; -NH-; -CH=N-; und/oder -S-(O=C)-;

25 (e) das Amphiphil eine mit linearen C₈ bis C₃₀-Alkoholen-veresterten 1,4- oder 1,5-Dicarbonsäuren wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Äpfelsäure,

Weinsäure, Citronensäure, Aconitsäure,
Citraconsäure und/oder Maleinsäure ist und/oder

- 5 (f) das Amphiphil eine mit linearen C8 bis C30-
Fettsäuren amidierten 1,4- oder 1,5- Diaminen des
3-Aminoalanins, Diaminobuttersäure, Ornithins oder
Lysin ist.

Die Erfindung betrifft also die Lehre, dass durch Konjugation von amphoteren Gruppen über einen Spacer an ein Amphiphil, das sich in liposomale Membranen einbauen lässt, Strukturen bereitstellen lassen, die insbesondere zur Herstellung von Liposomen verwendet werden können, die geeignet sind, im lebenden Organismus eingesetzt zu werden und hohe Mengen an Proteinen, Peptiden, Kohlenhydrate, DNA und / oder RNA binden und / oder transportieren können. Überraschenderweise sind die neuen Verbindungen geeignet zur Herstellung von Vesikeln oder Liposomen, die im Blut oder Serum nicht aggregieren, die durch Complementkomponenten nicht angegriffen werden, die nicht zytotoxisch sind und über mehrere Stunden im Blut oder Serum 10 stabil sind, wobei die Permeabilität der Liposomen vom pH-Wert und damit vom Ladungszustand der Verbindungen abhängig ist. D.h. die Wirkstofffreigabe dieser nicht-aggregierenden, 15 stabilen, nicht-zytotoxischen Liposomen erfolgt in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums.

20 25 Je nach verwendetem Amphotero und Amphiphil werden Verbindungen erhalten, die bei einem pH-Wert zwischen 4 und 9 ihre Ladung ändern und sich überraschenderweise zu einem hohen Anteil in liposomale Membranen einbauen lassen.

30 Im Zusammenhang mit der Erfindung sollen folgende Abkürzungen verwendet werden:

CHEMS Cholesterolhemisuccinat

PC Phosphatidylcholin

PE Phosphatidylethanolamin

PS Phosphatidylserin

Amphiphil

- 5 Die in diesem Molekülbaustein vorhandenen ein oder zwei langketigen Alkyle oder Acyle umfassen zwischen 8 und 30 C-Atome. Sie sind vorzugsweise geradkettig oder wenig verzweigt und können 0,1, oder 2 ethylenisch ungesättigte Bindungen aufweisen. Besonders bevorzugt sind solche Substituenten, die
10 man in natürlichen Lipiden findet, also geradkettige Fettsäuren oder Alkohole mit 12 bis 20 C-Atomen und keiner, einer oder zwei ungesättigten Bindungen. Ganz besonders bevorzugt sind Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleoyl- und Linoyl-Reste, beziehungsweise deren entsprechende
15 Fettalkohole.

Bevorzugt werden als Amphiphile Diacylglycerole, Dialkylglycerole, Phosphoglycerole, acyierte oder alkylierte 3-Amino-1,2-Propandiole oder auch die N,N-Dialkylamine
20 eingesetzt, da diese Verbindungen insbesondere billig verfügbar sind, eine einfache Chemie aufweisen und in einem hohen Anteil in Membranen eingebaut werden können, ohne deren Permeabilität zu erhöhen oder gar den Membrancharakter völlig zu zerstören.

25

In einer vorteilhaften Ausführung der Erfindung werden Dicarbonsäuren als polare Kopfgruppe des Amphiphils eingesetzt, die zweckmässigerweise eine Ankopplung der letztlich ladungstragenden Substituenten über weitere funktionelle Gruppen erlauben. Bevorzugt für die daraus abgeleiteten Amphiphile stehen: langketige Ester von 1,4-
30 oder 1,5- Dicarbonsäuren, wie etwa Asparaginsäure,

Glutaminsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Citronensäure, Aconitsäure, Citraconsäure, Maleinsäure oder ähnliche solcher Verbindungen mit Fettalkoholen. Besonders bevorzugt sind die Lauryl-, Myristyl-, Palmityl-, Stearyl-, Oleyl- und Linol-
5 Ester der genannten Dicarbonsäuren. Weitere Molekülbausteine (Spacer, Amphoteric) werden über die verbleibende Aminogruppe, Hydroxylgruppe, Carboxylgruppe oder über die Doppelbindung gekoppelt.

- 10 Andere vorteilhafte Amphiphile erhält man aus Diaminen mit einer weiteren funktionellen Gruppe etwa als Diamid des 3-Aminoalanins, der Diaminobuttersäure, des Ornithins oder Lysins mit langketten Fettsäuren. Darunter sind die Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearyl-, Oleoyl- und Linoyl-Reste
15 besonders bevorzugt.

- Letztlich lassen sich die erfindungsgemässen Verbindungen auch als Derivate des Sphingosins oder der Ceramide herstellen. Sie sind auch als Derivate langkettiger Vinylether oder
20 Plasmalogene darstellbar.

Die mit Vorteil als Ausgangsstoff verwendeten Amphiphile können an ihrer hydrophilen Kopfgruppe verschieden funktionalisiert sein um zweckmässigerweise eine beständige, aber auch biologisch abbaubare Ankopplung erlauben oder optional die Funktion eines räumlichen Spacers zu erfüllen. Besonders geeignet für eine direkte Kopplung sind die vorhandene Hydroxylgruppe oder eine Aminogruppe. Weiterhin geeignet sind auch Carboxylgruppen.

30

Amphoteric: Das Gesamt molekül erhält seine pH-abhängige Ladungscharakteristik durch die gleichzeitige Anwesenheit von

kationischen und anionischen Gruppen im Molekülteil "Amphoter". Ein Amphoter ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass bei einem bestimmten pH-Wert die Summe seiner Ladungsbestandteile gerade Null ist. Dieser Punkt wird 5 als isoelektrischer Punkt (iP) bezeichnet. Oberhalb des iP ist die Verbindung negativ geladen, unterhalb des iP ist sie als positives Kation aufzufassen; wobei der iP der erfindungsgemäßen Verbindungen zwischen 4,5 und 8,5 liegt.

- 10 Die Gesamtladung des Moleküls bei einem bestimmten pH-Wert des Mediums kann wie folgt berechnet werden:

$$z = \sum n_i \cdot ((q_{i-1}) + (10(pK - pH) / (1 + 10(pK - pH))))$$

- 15 q_i absolute Ladung der ionischen Gruppe unterhalb ihres pK (Beispiel: Carboxyl = 0, einfache Stickstoffbase = 1, zweifach veresterte Phosphatgruppe = -1)

ni Anzahl dieser Gruppen im Molekül

- 20 Eine erfindungsgemäße Verbindung entsteht beispielsweise durch Kopplung der Aminogruppe des Histidins an Dipalmitoylglycerolhemisuccinat. Das Produkt ist bei einem neutralen pH-Wert von 7 negativ geladen, da die vorhandene Carboxylfunktion im Wesentlichen vollständig dissoziert 25 vorliegt und die Imidazolfunktion nur gering aufgeladen ist. Bei einem sauren pH-Wert von etwa 4 sind die Verhältnisse umgekehrt: die Carboxylfunktion ist nun weitgehend entladen, die Imidazolgruppe jedoch im Wesentlichen vollständig protoniert, die Gesamtladung des Moleküls ist daher positiv.

30

Werden Phospholipide als Amphiphile verwendet, so muß die dort vorhandene konstante negative Ladung des Phosphats durch eine

zusätzliche positive Ladung kompensiert werden, damit eine erfindungsgemäße Verbindung entsteht. Eine Verbindung, die die erfängerische Lehre verdeutlichen soll, entsteht durch Kopplung von Histidin an Phosphatidylserin. Dabei ist es 5 unerheblich, ob die Kopplung zwischen der Carboxygruppe des Histidins und der Aminogruppe des PS erfolgt oder ob die Aminogruppe des Histidins an die Carboxylfunktion des PS gekoppelt wird. In beiden Fällen entstehen Moleküle, in denen eine freie Aminogruppe die konstant negative Ladung der 10 Phosphatgruppe neutralisiert. Die verbleibende Carboxylgruppe und die Imidazolfunktion reagieren wie oben, so dass es zur beabsichtigten Charakteristik vor erfindungsgemäßen Strukturen kommt.

- 15 In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung weist das Molekül einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 8, bevorzugt zwischen 5 und 7 auf.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der 20 Erfindung umfasst das Amphotere ein oder mehrere Kationen mit einem pKa-Wert zwischen 4 und 8 und gleichzeitig ein oder mehrere Anionen mit einem pKa-Wert zwischen 3 und 7. Amphotere können insbesondere aus zwei Ladungsträgern zusammengesetzt sein, die beide im benannten pH-Bereich zwischen 4 und 9 ihre 25 Ladung wechseln. Der gleichzeitig stattfindende Verlust an anionische Ladung und Gewinn an kationische Ladung führt zu einem Ladungswechsel des Gesamt moleküls.

Dabei umfasst eine besonders bevorzugte Ausführungsvariante 30 Amphotere, bei denen die pKa-Werte von Kation und Anion höchstens 2 pH-Einheiten auseinanderliegen. Besonders vorteilhaft wirkt sich das auf die Schärfe des iP aus. Je enger die beiden pKa-Werte beieinander liegen, desto enger ist der pH-Bereich, in dem die Molekülladung von kationisch zu

anionisch wechselt. Eine vorteilhafte Auswahl von Art und Anzahl der Kationen und Anionen kann der Fachmann anhand der oben genannten Formel vornehmen.

5 Es kann zweckmäßig sein, funktionelle Gruppen oder Molekülfragmente als Ladungsträger zu verwenden, die im pH-Bereich zwischen 4 und 9 voll dissoziiert vorliegen. Dazu gehören insbesondere Phosphorsäuregruppen, Sulfonsäuregruppen oder andere starke Anionen. Bevorzugt sind weiterhin die
10 meisten primären, sekundären oder tertiären Aminogruppen. Dazu gehören die quartären Ammonium-, Amidinium-, Pyridinium- und die Guanidinogruppen. Die Phosphorsäuregruppe der Phospholipide ist ein besonders vorteilhaftes Beispiel für diesen Molekülbestandteil.

15

Diese, feststehenden Ladungen des Amphoters müssen erfundungsgemäß durch die beschriebenen veränderlichen Ladungen überkomponiert werden. Dies ist nur möglich, wenn die veränderlichen Ladungsträger in einem Überschuss eingesetzt werden. Wird beispielsweise eine tertiäres Amin als Kation verwendet, so werden mindestens 2 Carboxygruppen benötigt, um ein Amphotter im Sinne der Erfindung zu erhalten. Bei nur einer Carboxylgruppe kann nur die positive Ladung des Amins komponiert werden, das Molekül niemals vollständig umladen. Vorteilhaft bei der Verwendung voll dissoziierter Gruppen ist deren starke Polarität.

Amphotere können besonders bevorzugt als komplette Struktureinheiten vorliegen. Das ist vorzugsweise der Fall bei den o-, m- oder p-Aminobenzoesäuren, der Imidazolcarbonsäure, der Imidazoldiessigsäure oder auch der Nicotinsäure oder Picolinsäure.

Weitere vorteilhafte Verbindungen sind beispielsweise w-(1-Piperazino)alkylcarbonsäuren, Urocansäure, 4-(2-Aminoethyl)-imidazol-maleinsäuremonoamid, 4-(2-Hydroxyethyl)imidazol-maleinsäuremonoester, (2-Aminoethyl)morpholin-maleinsäure-monoamid oder analoge Verbindungen.

pH-sensitive Kationen mit einem pKa zwischen 4 und 8: Bevorzugt ist das Kation ein Imidazol, Piperazin, Morpholin, Purin oder Pyrimidin. Weitere vorteilhafte Kationen mit dieser Eigenschaft sind im wesentlichen Stickstoffbasen. Insbesondere wenn die Stickstoffbasen als Ringsysteme vorliegen, existieren vorteilhafterweise Stellungsisomere, bei denen der verbindende Spacer an verschiedenen Positionen des organischen Kations substituiert ist. Durch die Stellungsisomerie lassen sich zweckmäßigerweise die pKa-Werte der organischen Kationen beeinflussen. Die dem zugrunde liegenden Regeln sind dem Fachmann bekannt. Alternativ können diese Einflüsse aus Tabellenwerken abgeschätzt werden (Handbook of Chemistry and Physics, 73. Band, S. 8 - 37 ff.).

20

Vorteilhafte organische Kationen sind die insbesondere folgenden Stoffklassen:

o-, m-, p-Aniline; 2-,3- oder 4-substituierte Anisidine, Toluidine oder Phenetidine; 2-, 3-, 5-,6-, 7-oder 8-substituierte Benzimidazole, 2-, 3-, 4- oder 5-substituierte Imidazole, 1-, oder 5-substituierte Isochinoline, 2-,3- oder 4- substituierte Morpholine, 2-,3- oder 4- substituierte Picoline, 1-, 2-, oder 3- substituierte Piperazine, 2-, 5- oder 6-modifizierte Pterine, 3-,4-, 5-, 6- oder 9- substituierte Purine, 2- oder 3- substituierte Pyrazine, 3- oder 4- substituierte Pyridazine, 2-, 3- oder 4- modifizierte Pyridine, 2-, 4-, 5- oder 6-substituierte Pyrimidine, 1-,2-,3-,4-,5-, 6- oder 8- substituierte Chinoline, 2-, 4- oder 5-

substituierte Thiazole, 2-, 4- oder 6- substituierte Triazine,
oder auch Abkömmlinge des Tyrosins.

Besonders bevorzugt sind die genannten Piperazine, Imidazole
5 und Morpholine, Purine oder Pyrimidine. Ganz besonders
bevorzugt sind solche Molekülfragmente, wie sie in
biologischen Systemen vorkommen, also beispielsweise 4-
Imidazole (Histamine, Histidin selbst), 2-, 6- oder 9- Purine
(Adenine, Guanine, Adenosine oder Guanosine), 1-, 2- oder 4-
10 Pyrimidine (Uracile, Thymine, Cytosine, Uridine, Thymidine,
Cytidine) oder auch Pyridin-3-carbonsäuren. Die hier genannten
Strukturfragmente können weitere Substituenten aufweisen. Das
können beispielsweise Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder
15 Isopropylreste sein, besonders bevorzugt in hydroxylierte Form
mit einer oder zwei Hydroxylgruppen. Das können aber auch
Hydroxyl- oder Ketofunktionen des Ringsystems sein.

Stickstoffbasen mit bevorzugten pKa-Werten entstehen
beispielsweise auch durch einfache oder mehrfache Substitution
20 eines Amins mit Niederalkanhydroxylen, etwa Hydroxymethyl-
oder Hydroxyethylgruppen. Geeignete organische Basen aus
dieser Gruppe sind beispielsweise Aminopropandiole,
Triethanolamine, Tris-(hydroxymethyl)methylamine, Bis-
(hydroxymethyl)methylamine, Tris-(hydroxyethyl)methylamine,
25 Bis-(hydroxyethyl)methylamine oder die entsprechend
substituierten Ethylamine.

Stickstoffbasen mit bevorzugten pKa-Werten sind auch unter den
Aminozuckern oder Aminozuckeralkoholen zu finden.

30 pH-sensitive Anionen des Amphoters mit einem pKa zwischen 3
und 7: Bevorzugt sind die anionischen Ladungsträger
Carboxylgruppen. Selbstverständlich können alle Carbonsäuren
als Ladungsträger eingesetzt werden. Dazu gehören insbesondere

aliphatische, geradkettige oder verzweigte Carbonsäuren mit bis zu 8 C-Atomen und 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen. Beispielhafte Verbindungsteile sind die Carboxylgruppe selbst, die in der aliphatischen Kette gebundene Essigsäure, Bromessigsäure, Chloressigsäure, Acetoessigsäure, Propionsäure, Acrylsäure, Buttersäure, Crotonsäure oder höhere Carbonsäure, die einfach veresterte oder amidierte oder in der aliphatischen Kette gebundene Dicarbonsäure wie Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Caprylsäure, Pimelinsäure, Suberinsäure, Cyclohexandicarbonsäure oder auch Cyclopentandicarbonsäure; die einfach veresterte oder amidierte oder im aliphatischen Teil gebundene Oligocarbonsäure wie Citronensäure, Isocitronensäure oder Ethylendiamintetraessigsäure.

Weitere vorteilhafte Verbindungsteile sind die in der Seitenkette über ein Heteroatom gebundene Glykolsäure, Milchsäure, Hydroxybuttersäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Asparaginsäure oder Glutaminsäure, Alanin, Glycin, Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin, Prolin, Tyrosin oder Cystein oder andere Aminosäuren oder Hydroxysäuren.

Carbonsäuren mit einem geeigneten Verhalten findet man auch als Substituenten aromatischen Systeme, etwa als Benzoësäure, Anissäure, o-, m- oder p-Hydroxybenzoësäure, als Dihydroxybenzoësäure, Gallussäure, Zimtsäure, Phenylessigsäure, Hippursäure, Pthalsäure, Terephtalsäure, 2,3 oder 4-Pyridincarbonsäure, Furancarboxylsäure. Andere anionische Gruppen sind dissoziierbare Hydroxyle oder Thiole, wie sie in der Ascorbinsäure, dem N-substituierten Alloxan, der N-substituierten Barbitursäure, im Veronal, dem Phenol oder als Thiolgruppe vorkommen.

Peptide als Amphotere: In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Amphotere Peptide und umfassen 2 bis 6 Aminosäuren. Besonders bevorzugt sind in einer weiteren Ausführungsform insbesondere die Aminosäuren Histidin,
 5 Arginin, Lysin, Glutaminsäure oder Asparaginsäure zur Bildung des Amphoters und zur Bestimmung seiner Ladungscharakteristik. Weitere bevorzugte Aminosäuren sind Glycin, Serin, Threonin, Glutamin, Asparagin, aber auch Cystein, die zur Erhöhung der Polarität und damit zur Verbesserung der Löslichkeit des
 10 Amphoters beitragen. Besonders bevorzugte Zusammensetzungen der Peptide zeigt die folgende Tabelle 1 in prozentualem Anteil an Gesamtaminosäure:

15

Tab.1

Aminosäure	His	Arg/Lys	Asp/Glu	Bedingungen
i	Bis 66%	---	Bis 66%	His, Asp/Glu ≠ 0
ii	---	< 50% > Arg/Lys	Arg/Lys, Asp/Glu ≠ 0	
iii	≤ 33%	≤ 33% > Arg/Lys		alle ≠ 0

20 Wobei i) den Fall zweier pH-sensitiver Komponenten, ii) den Fall einer feststehenden und einer pH-sensitiven Komponente und iii) den Fall einer Mischung von i) und ii) behandeln. Die Sequenz der einzelnen Aminosäuren ist beliebig, es kommt für die Ladungscharakteristik hauptsächlich auf die globale
 25 Zusammensetzung an. Terminale Gruppe des Peptids werden geblockt, im Falle des C-Terminus als Amid, im Fall des N-Terminus mit Acetyl.

Spacer: Zwischen dem Amphoter und dem Amphiphil liegen die Molekülfragmente: - Y - Spacer - X. Der Spacer ist ein Niederalkylrest mit linearer, verzweigter oder ringförmiger Struktur, der 0 bis 8 C-Atome besitzt und 0, 1 oder 2 ethylenische ungesättigte Bindungen enthält. Der Spacer kann zur Erhöhung der Polarität des Moleküls Hydroxylgruppen besitzen. Der Spacer kann insbesondere ein Zucker sein. Spacer kann vorteilhafterweise auch ein Polyethylenlykol sein, wobei dieser bis zu 20 Monomereinheiten umfassen kann.

X und Y: Bevorzugt umfasst die verbindende Gruppe X die Struktur -(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; -NH-(C=O)-O-; -O-; -NH-; -CH=N- oder -S-S-. Vorteilhafterweise entspricht die verbindende Gruppe Y in ihrer Struktur der Gruppe X, zusätzlich kann sie die Struktur -O-(O=C)-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -O-(O=C)-NH- oder -N=CH- umfassen. X und / oder Y können auch Deletionen sein, d.h. ihre Anwesenheit ist nicht zwingend. Die Gruppe Y kann beispielsweise entfallen, wenn sich das Amphoter direkt an das Amphiphil koppeln lässt, beispielsweise bei der Veresterung von Imidazol-4,5-dicarbonsäure mit Dipalmitoylglycerol.

Synthesemethoden: Methoden zur Ausführung der chemischen Kopplung der einzelnen Molekülbausteine sind dem Fachmann bekannt und können je nach verwendetem Ausgangsstoff und Kopplungskomponente variieren. Typische Reaktionen sind die Veresterung, die Amidierung, die Addition von Aminen an Doppelbindungen, die Veretherung oder auch die reduktive Aminierung.

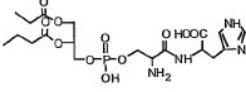
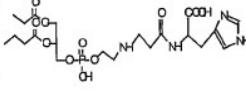
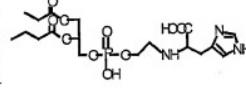
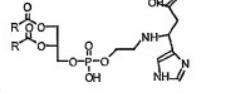
Besonders bevorzugte Moleküle lassen sich herstellen durch

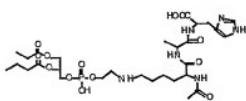
- i) Veresterung von Diacylglycerolen,
 - ii) Veresterung oder Amidierung von Diacylglycerolhemisuccinat,
 - 5 iii) Addition von Aminen an die Doppelbindung eines Diacylglycerolhemimaleats,
 - iv) Amidierung von Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin,
 - v) Amidierung oder Alkylierung von 3-Amino-1,2-propandioldiestern,
 - 10 vi) Oxidation von Phosphatidylglycerolen und anschliessende reduktive Aminierung und
 - vii) reduktive Aminierung von Glyceraldehyd und anschliessende Acylierung.
- 15 Zu den besonders bevorzugten Verbindungen gehören die folgenden Ausführungsformen (die langkettigen Kohlenwasserstoffketten der Amphiphile sind nur in verkürzter Schreibweise wiedergegeben und entsprechen Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleoyl- und Linoyl-Resten):

20

Phospholipide

	#7 Histidinyl-Phosphatidylserin durch Kopplung von Histidin an die Aminogruppe des Phosphatidylserin
--	---

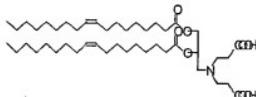
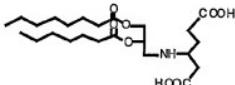
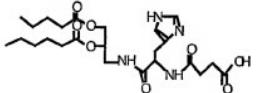
	<p>#26 Phosphatidylseryl-Histidin durch Kopplung von Histidin an die Carboxygruppe des Phosphatidylserin</p>
	<p>#25 Derivat des Phosphatidylglycerols. Die Ankopplung von Carnosin erfolgt nach Reaktion vi)</p>
	<p>#29 Derivat des Phosphatidylglycerols. Die Ankopplung erfolgt nach Reaktion vi) mit Histidin</p>
	<p>#28 N-Phosphatidylethyl-3-amino-5-imidazoylcarbonsäure: a) Addition des Phosphatidylethanolamins an Urocansäure nach iii) oder b) nach vi) mit β-Histidin und Phosphatidylglycerol</p>



#31 Acetyl-Lys-Ala-His
gekoppelt über die Seitenketten
Aminogruppe des Lys an DPPG
nach vi)

1-Amino-2,3-Propandiole

5

	<p>#8 Addition von Acrylsäure an 1-Amino-2,3-Propandiol und anschließende Acylierung</p>
	<p>#32 Kondensationsprodukt aus Homoglutaminsäure und doppelt acyliertem 1-Iod-2,3-Propandiol</p>
	<p>#36 Kopplung von CBZ-Histidin an doppelt acyliertes 1-Amino-2,3-Propandiol; Entschützen; Kopplung mit Succinanhydrid;</p>

	#37 Kopplung von Succinanhydrid andoppelt acyliertes 1-Amino-2,3-Propandiol; Kopplung von Benzyl-geschütztem Histidin; Entschützen
	#38 Konjugation von β -Histidin an ein doppelt acyliertes 1-Jod-2,3-Propandiol

Diacylglycerole

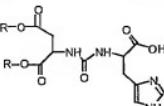
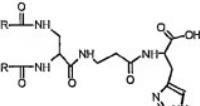
	#34 Konjugation von Histidin an ein Diacylglycerolhemisuccinat
	#35 Konjugation von Histidin an ein Diacylglycerol und anschließende Kopplung mit Succinanhydrid

5

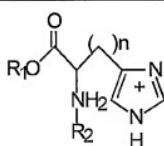
Dicarbonsäuren und Diamine

- 10 Die langkettigen Amphiphile sind nur in verkürzter Schreibweise wiedergegeben und entsprechen Lauryl-, Myristyl-, Palmityl-, Stearyl-, Oleyl- und Linyl-Resten.

	#50 N-(Asparaginsäuredihydroxyalkyl)-3-amino-5-imidazolcarbonsäure, kann durch Addition von Asparaginsäurediester an Urocansäure dargestellt werden.
--	--

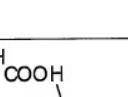
	#51 N-(Aspartyl dihydroxyalkyl)-N'-histidinyl-harnstoff.
	#52 doppelt acyliertes Tripeptid aus 2,3-Diaminopropionsäure, β -Alanin und Histidin.

Zu den besonders bevorzugten amphoteren Komponenten gehören beispielsweise die folgenden Verbindungen, wobei R1 oder R2 das Amphiphil bedeuten und ()n weitere Molekülteile im Sinne des oben definierten Spacers darstellen.

	Histidin-Derivate. Bevorzugt erfolgt die Ankopplung des Amphiphils über die Aminogruppe als R2. R1 bildet in diesem Fall ein Anion und kann beispielsweise H oder eine Hydroxycarbonsäure oder eine oder mehrere Aminosäuren sein. Erfolgt die Ankopplung über R1, dann ist R2 ein anionischer Rest, etwa eine Carbonsäure oder Dicarbonsäure.
---	--

<p>Phosphatidylserin—NH</p>	<p>Piperazin-Derivate.</p> <p>Die Ankopplung des Amphiphils kann über eines der Ringatome erfolgen. Sind die Seitenketten als Hydroxycarbonsäuren oder Aminosäuren ausgeführt, so kann die Ankopplung vorteilhafterweise über diese Heteroatome erfolgen. Das bevorzugte nebenstehende Derivat zeigt die Ankopplung von Piperazin an das Nα des Phosphatidylserin.</p>
	<p>Morpholin-Derivate</p> <p>Die Ankopplung des Amphiphils kann über eines der Ringatome erfolgen. Sind die Seitenketten als Hydroxycarbonsäuren oder Aminosäuren ausgeführt, so kann die Ankopplung vorteilhafterweise über diese Heteroatome erfolgen.</p>
	<p>Derivate der Imidazol-4,5-diessigsäure.</p> <p>Die Anbindung des Amphiphils erfolgt bevorzugt als Ester einer der beiden Essigsäurefunktionen. Das Amphiphil kann aber auch an die 3-Aminofunktion angebunden sein.</p>

	<p>Derivate des Piperidins.</p> <p>Die Ankopplung des Amphiphils kann über eins der Ringatome erfolgen. Sind die Seitenketten als Hydroxy- oder Aminosäuren ausgeführt, dann kann die Ankopplung vertieft über deren Heteroatome erfolgen.</p>
 	<p>Diaminobenzoic acid-Derivate.</p> <p>Hier erfolgt die Ankopplung des Amphiphils bevorzugt über eine der beiden Aminogruppen. Die zweite Aminogruppe kann beispielsweise alkyliert sein, um einen höheren pKa-Wert zu erhalten.</p> <p>Eine Ankopplung als Amid des Phosphatidylserins ist eine andere bevorzugte Ausführung der Erfindung.</p>
	<p>Trinitriloessigsäure-Derivate.</p> <p>Amphotere Gruppen entstehen auch durch Veresterung von Trinitriloessigsäure. Das Ladungsverhalten dieser Verbindungen kann zusätzlich durch die Komplexierung von Metallionen verändert werden.</p>

  	<p>Na-Alkylcarboxy-Aminosäure-Derivate</p> <p>Amphotere Verbindungen entstehen auch hier durch Kopplung von Sterolen an die endständigen Gruppen von N-Acylaminosäuren. Die Struktur kann vorteilhaft vom Serin, der Asparaginsäure oder Glutaminsäure oder vom Lysin oder Ornithin abgeleitet werden. Die Aminodicarbonsäuren können nicht nur endständig, sondern auch an den anderen Säuregruppen gekoppelt sein. Das Ladungsverhalten dieser Verbindungen kann zusätzlich durch die Komplexierung von Metallionen verändert werden.</p>
	<p>EDTA-Derivate</p> <p>Amphotere Gruppen entstehen auch durch Veresterung von Trinitrioloessigsäure. Das Ladungsverhalten dieser Verbindungen kann zusätzlich durch die Komplexierung von Metallionen verändert werden.</p>

Die Erfindung betrifft auch Liposomen, die die erfundungsgemäßen Verbindungen umfassen. Die erfundungsgemäßen Verbindungen lassen sich in einem hohen Anteil in liposomale Membranen einbauen und bilden amphotere Liposomen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sich ihr Ladungszustand reversibel durch pH-Änderung des umgebenden Mediums verändert. Unterhalb ihres isoelektrischen Punktes sind die Liposomen kationisch, oberhalb anionisch.

Liposomen, umfassend die erfindungsgemäßen Verbindungen können unter geeigneten Bedingungen mit Polymeren beschichtet werden. Dabei kann eine einfache oder mehrfache Abscheidung solcher Substanzen auf der Oberfläche erfolgen. Bei einer 5 mehrfachen Abscheidung, die gegebenenfalls unter Anwesenheit von Vernetzer durchgeführt wird, entstehen liposomale Nanokapseln. Verfahren zur Herstellung der Liposomen sind dem Fachmann z.B. aus der WO 00/28972 oder der WO 01/64330 bekannt, die in dem Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen 10 sind. Besonders vorteilhaft bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen ist die Tatsache, dass eine elektrostatische Interaktion mit dem Polymer unterbrochen werden kann, wenn dieses ein Polyelektrolyt ist. Es ist bekannt, dass die Wechselwirkung eines Polyelektrolyten mit 15 Ladungsträgern der liposomalen Membran zur Entmischung von Membranbestandteilen und zur Bildung von Lipidclustern führen kann. In vielen Fällen geht diese Entmischung mit einer Permeabilisierung des Liposoms einher. Die erfindungsgemäßen Substanzen ermöglichen eine Abschaltung dieser Wechselwirkung 20 nach dem Beschichtungsprozess. Wird der pH-Wert zu diesem Zeitpunkt auf oder über den iP erhöht, so sind die Liposomen nur noch sterisch in der Nanokapseln eingeschlossen, eine Wechselwirkung der Membran mit den Polyelektrolyten besteht dann nicht mehr. Clusterbildung der Lipide und damit 25 verbundene Permeabilisierung der Membran können so vorteilhafterweise umgangen werden.

Es wurde überraschend gefunden, dass Liposomen, deren Membran die erfindungsgemäßen Substanzen enthalten, unterhalb des 30 isoelektrischen Punktes der Substanz leicht mit anderen Membranen, insbesondere Zellmembranen fusionieren. Für gewöhnlich erfordert dieser Schritt die Anwesenheit eines größeren Anteils von PE in der Membran. Dieses hat durch seine Neigung zur Bildung von hexagonalen Phasen die Funktion eines 35 Helferlipids. Nachteilig ist aber die geringere Stabilität

solcher Membranen, hier wird oft eine schleichende Freisetzung von eingeschlossenen Wirkstoffen beobachtet.

Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen hergestellt werden, fusionieren vorteilhafterweise effektiv auch in Abwesenheit von Helferlipiden. Es sind also unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen Liposomen herstellbar, die einen Wirkstoff stabil verkapseln können, aber unter den Bedingungen eines niedrigen pH-Werts mit Zellmembranen fusionieren und dort den Wirkstoff freisetzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der Anteil der amphoteren Lipide maximal 30 mol%, 40 mol% oder 50 mol% des Gesamtlipids. Besonders vorteilhaft sind Zusammensetzungen, die mindestens 2 mol%, höchstens aber 50 mol% der amphoteren Lipide umfassen. Besonders bevorzugt sind Zusammensetzungen, die mindestens 5 mol%, bevorzugt 10 mol% und höchstens 50 mol%, bevorzugt 40 mol% des amphoteren Lipids umfassen. Die Herstellung von Liposomen umfassend die erfinderischen Substanzen erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Techniken.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung umfassen die Liposomen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Diacylglycerole, Ceramide, Sphingolipide, Tetraetherlipide und/oder PEG-Lipide. Da die erfindungsgemäßen Verbindungen nicht immer selbst Liposomen bilden, kann es vorteilhaft sein, die genannten Lipide zuzusetzen.

30

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung weisen die Liposomen eine mittlere Größe zwischen 50

und 1000 nm, bevorzugt zwischen 50 und 500 nm, besonders bevorzugt zwischen 50 und 300 nm und ganz besonders bevorzugt zwischen 60 und 130 nm auf.

5 Zweckmäßig ist es, in die Liposomen insbesondere wasserlösliche Wirkstoffe einzuschließen. Sie können z.B. in der Krebstherapie und zur Therapie schwerer Infektionen verwendet werden. Liposomendispersionen können dazu injiziert, infundiert oder implantiert werden. Sie verteilen sich danach
10 im Blut oder in der Lymphe oder geben als Depot ihren Wirkstoff kontrolliert ab. Letzteres kann durch hochkonzentrierte Dispersionen erreicht werden, die als Gele vorliegen. Die Liposomen können auch für topische Anwendung auf der Haut eingesetzt werden. Sie können insbesondere dazu
15 beitragen, dass verschiedene Wirkstoffe besser in die Haut eindringen können oder sogar durch die Haut in den Körper gelangen können. Weiterhin ist es möglich die Liposomen für den Gentransfer einzusetzen. Genetisches Material kann wegen seiner Größe und Ladung meist nicht ohne Hilfsmittel in Zellen
20 gelangen. Dazu bedarf es geeigneter Träger wie z.B. Liposomen oder Lipid-Komplexe. Diese sollen zusammen mit der DNA effizient und möglichst gezielt in die betroffenen Zellen aufgenommen werden. Besonders vorteilhaft ist es, wenn der Wirkstoff ein Protein, ein Peptid, eine DNA, eine RNA, ein
25 antisense-Nukleotid und/oder ein Decoy-Nukleotid ist. Liposomen sind in ihrer prinzipiellen Struktur den Zellmembranen sehr ähnlich. Sie können daher als Membranmodelle eingesetzt werden, um die Permeationsgeschwindigkeit von Wirkstoffen durch Membranen oder die
30 Membranbindung von Wirkstoffen zu quantifizieren.

In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung sind mindestens 50 μ g, vorteilhafter 100 μ g, bevorzugt 150 μ g des Wirkstoffes pro mg Lipid in den Liposomen eingeschlossen.
35 Nicht eingebaute, außen anhaftende Cargomoleküle können wenn

nötig durch einen einfache Erhöhung des pH-Wertes entfernt werden. Dieser Schritt ist immer dann notwendig, wenn nicht eingegebene Cargomoleküle zu einer Aggregation der Liposomen führen. Vorteilhaft bei der Verwendung der erfundungsgemäßen Komponenten ist die Tatsache, dass die eingeschlossenen Wirkstoffe nur für den Zeitraum des eigentlichen Einschlusses unter Bedingungen gebracht werden müssen, die eine Interaktion mit der Lipidschicht erlauben. Sobald die Lipidschicht in sich geschlossen bleibt, kann zu anderen Bedingungen gewechselt werden. Eine denkbare Inaktivierung von Wirkstoffen, insbesondere von Proteinen kann dadurch minimiert werden.

Die Erfinlung betrifft auch Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen, wobei ein Bindungs-pH-Wert zur Verkapselung benutzt wird und ein zweiter pH-Wert zur Abtrennung der nicht gebundenen Wirkstoffe verwendet wird.

Die Erfinlung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen, wobei die Liposomen bei einem bestimmten pH-Wert permeabilisiert und folgend verschlossen werden. Bevorzugt können insbesondere Permeabilitätsänderungen gezielt zur Beladung von Liposomen genutzt werden. Ein einzuschließender Wirkstoff kann dabei unter Bedingungen hoher Permeabilität ins Medium zugegeben werden. Anschließend werden Bedingungen geringer Permeabilität eingestellt. Damit verbleibt der Wirkstoff im Innern der Liposomen. Nicht eingeschlossener Wirkstoff kann dann gegebenenfalls abgetrennt werden. Eine solche Permeabilitätsänderung kann an Liposomen oder an liposomalen Nanokapseln herbeigeführt werden.

30

Die Erfinlung betrifft auch die Verwendung der Liposomen in der Diagnostik und in Freisetzungssystemen. Die Liposomen können selbstverständlich auch in einem Detektionssystem verwendet werden. Insbesondere können die Liposomen mit

Metallionen beladen werden, deren Fluoreszenz durch die Chelatisierung verstärkt wird, also beispielsweise Terbium- oder Europiumionen. Liposomen für diese Anwendung können selbstverständlich spezifitätsbestimmende Komponenten 5 enthalten, also z.B. Antikörper, Lektine, Selektine, Rezeptoren oder Hormone oder RNA-Aptamere. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die Anwesenheit dieser Metallionen auf das Lumen der Liposomen beschränkt, um unspezifische Signale von außen 10 anhaftendem und langsam freigesetztem Metallionen zu vermeiden. Zweckmäßig ist es auch, die Liposomen zur Herstellung von Nanokapseln zu verwenden. Mit Vorteil können 15 die Liposomen zur Herstellung von Freisetzungssystemen in der Diagnostik verwendet werden.

15

Zweckmäßig ist auch die Verwendung zum Transport und/oder zur Freisetzung von Wirkstoffen. Vorteilhafterweise können die Liposomen als Depotformulierung und/oder als zirkulierbares Depot verwendet werden. Vorteilhaft ist weiterhin die 20 Verwendung der Liposomen als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro und/oder ex vivo. Die Liposomen sind beispielsweise bei intravenöser und/oder peritonealer Applikation verwendbar.

25 Die erfindungsgemäßen Verbindungen und Liposomen weisen mehrere Vorteile auf. Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass die Permeabilität der erfindungsgemäßen Liposomen vom pH-Wert und damit vom Ladungszustand der Verbindungen abhängig ist.

30

Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Strukturen hergestellt werden, sind daher insbesondere geeignet zur Konstruktion von Freisetzungssystemen, bei denen

eine Abgabe von Wirkstoffen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums erfolgen soll.

Es wurde darüber hinaus überraschenderweise gefunden, dass in
5 Liposomen, deren Membran die erfindungsgemäßen Verbindungen umfasst, überdurchschnittlich hohe Mengen, mindestens 50 μ g, bevorzugt 100 μ g, besonders bevorzugt 150 μ g an Proteinen oder DNA pro mg Lipid eingeschlossen werden können. Die Effizienz dieses Einbaus ist dabei abhängig vom pH-Wert der verwendeten
10 Lösung. Ein Prozess für die effiziente Verkapselung von Proteinen oder DNA in die Liposomen kann daher so geführt werden, dass zunächst ein pH-Wert eingestellt wird, der zu einer guten Bindung der Cargomoleküle an die Lipidschicht führt. Für DNA als Polyanion werden hier niedrige pH-Werte von
15 etwa 4 bis 5 verwendet. Bei Proteinen richtet sich der nutzbare pH-Wert nach dem isoelektrischen Punkt des Proteins. Dieser sollte unterhalb des isoelektrischen Punktes der erfindungsgemäßen Substanz liegen. Eine Verkapselung ist dann besonders effektiv, wenn der pH-Wert des Mediums so gewählt
20 wird, dass er zwischen dem isoelektrischen Punkt des Proteins und dem isoelektrischen Punkt der erfindungsgemäßen Verbindung liegt. Das Protein ist dann negativ und die Lipidschicht ist positiv geladen.

25 Weiterhin wurde überraschend gefunden, dass Liposomen, deren Membran beispielsweise Histidinyl-PS oder Histidinyl-Diacylglycerolhemisuccinat umfasst, zur Chelatisierung von Metallionen befähigt sind. Diese Eigenschaft führt zu einer Verstärkung der positiven Ladung des Liposoms. Dieser Effekt
30 ist besonders stark bei neutralen pH-Werten zu beobachten, da dann die Eigenladung der Verbindung gering ist. Aufgrund ihrer chelatisierenden Eigenschaften lassen sich solche Liposomen in der biochemischen Diagnostik und zur pharmazeutischen Therapie verwenden.

- Eine wesentliche Voraussetzung für die Verwendung von Liposomen für experimentelle oder therapeutische Zwecke ist deren Verträglichkeit mit Zellen und Geweben. Eine Reihe 5 bekannter Verbindungen, die für das Einbringen von DNA oder Proteinen in Zellen genutzt werden (beispielsweise das kationische Lipid DOTAP) sind zytotoxisch. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass einige der erfindungsgemäßen Verbindungen eine verringerte Zytotoxizität 10 zeigen. Das betrifft insbesondere die Gruppe von Verbindungen, bei denen das Amphotericin A eine Aminosäure oder ein Peptid ist. Diese erfüllen daher wesentliche Voraussetzungen eines Transfektionssystems.
- 15 Eine weitere Voraussetzung für die Konstruktion von Vektoren zum Gen- oder Proteintransport in Zellen ist deren Kompatibilität mit Serum oder Blut. Wegen ihrer starken kationischen Ladung bilden die derzeit bekannten Vektoren mit Serum unkontrollierte große Aggregate, die im Organismus zur 20 Bildung von Thromben führen. Ihre Verwendung ist damit in vivo praktisch ausgeschlossen und auf in vitro oder ex vivo Anwendungen beschränkt. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Komponenten aufgebaut wurden, in Serum oder Blut keine 25 Aggregate bilden. Das sind insbesondere solche Liposomen, deren isoelektrischen Punkt kleiner als 7,5 ist.

Eine weitere Voraussetzung für die Konstruktion von Vektoren zum Protein- oder Gentransfer ist deren Stabilität unter 30 physiologischen Bedingungen. Liposomen werden bei einer Applikation in den Blutkreislauf vom Bestandteilen des Complementsystems angegriffen und schnell lysiert. Diese Reaktion erfolgt binnen Minuten. Es kommt zur Porenbildung in der Membran, durch die selbst grosse Moleküle wie Proteine

ausdiffundieren können. Eine Stabilisierung von Liposomen gegenüber diesen Mechanismen ist bisher nur durch Einbau von Cholesterin in die Lipidschicht möglich. Solche Liposomen sind dann sehr stabil, können aber nicht mehr mit Zellen wechselwirken oder ihren Wirkstoff leicht abgeben. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Komponenten aufgebaut werden, in Serum oder Blut über mehrere Stunden stabil sein können. Die Wirkstofffreisetzung ist auch unter diesen Bedingungen gering. Eine liposomaler Vektor für den Transport von Wirkstoffen muss mindestens drei Voraussetzungen erfüllen: er muss eine geringe Toxizität besitzen, den Wirkstoff sicher und stabil einschließen und kompatibel mit Serum oder Blut sein.

Alle drei dieser Voraussetzungen werden von Liposomen, die unter Verwendung ausgewählter erfindungsgemäßer Substanzen hergestellt sind, mit Vorteil erfüllt. Die Liposomen sind daher für eine Verwendung bei therapeutischen Zwecken gut geeignet. Weitere Eigenschaften, die diese Verwendung unterstützen, sind die gute Beladbarkeit mit Wirkstoffen und die gezielte Ablösung dieser Stoffe durch Veränderungen des pH-Werts oder durch Permeabilisierung der Membran. Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen hergestellt werden, zeigen nur eine geringe unspezifische Bindung an Zelloberflächen. Diese geringe unspezifische Bindung ist eine wesentliche Voraussetzung für das Zustandekommen einer spezifischen Bindung an Zielzellen. Werden die beschriebenen Liposomen mit weiteren Liganden versehen, so ist eine Zielsteuerung der Vehikel gegeben. Der Wirkstoff kann dann spezifisch an solchen Zellen oder Geweben angereichert werden, die pathologische Zustände aufweisen.

Eine wesentliche Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen liegt daher bei der Konstruktion von Vektoren für den Wirkstofftransfer in lebenden Organismen. Die Vektoren sind

besonders geeignet für den Transport von therapeutischen Makromolekülen wie etwa Proteinen oder DNA, die von sich aus nicht die Zellmembran überwinden können oder im Blutstrom schnell abgebaut werden.

5

Überraschenderweise wurde gefunden, dass auch amphotere Amphiphile mit nur einer Kohlewasserstoffkette, wie sie in der US 6,255,344 offenbart sind, sich zur Herstellung von erfindungsgemäßen amphoteren Liposomen eignen, wenn die 10 Kohlenwasserstoffkette mehr als 12 CH₂-Gruppen umfasst. Diese Liposomen lassen sich mit Vorteil nach dem oben genannten Verfahren mit Wirkstoff, insbesondere DNA oder Oligonucleotiden beladen und ihre Verwendung zur Transfektion von Zellen sowie zur Gentherapie wird in den 15 Offenbahrungsgehalt der vorliegenden Erfindung mit aufgenommen.

Ebenso wurde überraschenderweise gefunden, dass sich zweikettige Amphiphile, die durch Amidierung von langkettigen 20 Fettsäuren mit langkettigen α -amino-Carbonsäuren gebildet werden und mit einer amphoteren Gruppe, wie zum Beispiel Histidin versehen werden, sich ebenfalls zur Herstellung von amphoteren Liposomen eignen. Diese Liposomen lassen sich mit Vorteil nach dem oben genannten Verfahren mit Wirkstoff, 25 insbesondere DNA oder Oligonucleotiden beladen und ihre Verwendung zur Transfektion von Zellen sowie zur Gentherapie wird in den Offenbahrungsgehalt der vorliegenden Erfindung mit aufgenommen.

30 Die erfindungsgemäße Lehre soll an den folgenden Beispielen näher erläutert werden, ohne sich auf diese zu beschränken.

Beispiel 1**Synthese von L-Histidinyl-Dipalmitoylglycerolsuccinat (DG-Succ-Hist, #34)**

5 Zur Synthese des DG-Succ-Hist werden 3 mmol (2 g) Diacylglycerol-Succinat (Avanti) mit 3,3 mmol (0,81 g) Benzylgeschütztem Histidin, 3,45 mmol (0,71 g) DCC und 3,45 mmol (0,42 g) DMAP in 50 ml Dichlormethan als Lösungsmittel umgesetzt. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei
10 Raumtemperatur Röhren gelassen. Nach erfolgter Amid-Kopplung wird die Carbonylgruppe des Histidins mittels katalytischer Hydrogenolyse an 10% Palladium/Kohlenstoff und Röhren über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre entschützt. Nach Einengen des Reaktionsansatzes im Vakuum erfolgt die
15 säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel 60. Als Laufmittel wird Chloroform / Methanol / Ammoniak (25%ige Lösung) 60:40:2 verwandt.

Beispiel 2**Synthese von Verbindung #35 (DG-Hist-Succ)**

Die Synthese des DG-Hist-Succ erfolgt in drei Stufen. Zunächst werden 3,7 mmol (2g) Dipalmitoylglycerol mit 4,1 mmol Aminogeschütztem CBZ-Histidin verestert. Die Esterbildung erfolgt
25 unter Zugabe von 4,3 mmol (0,67 g) EDC und 4,3 mmol (0,53 g) DMAP in 60 ml Dichlormethan. Der Ansatz wird für 4 h geführt. Durch Entschützung der Aminofunktion des Histidins entsteht das Zwischenprodukt DG-Hist. Die Aminogruppe wird mittels katalytischer Hydrogenolyse an 10 % Palladium/Kohlenstoff
30 durch Röhren über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre entschützt. In einer zweiten Stufe wird Bernsteinsäureanhydrid mit Benzylalkohol zum Benzylsuccinat geöffnet. 10 mmol (1 g) Bernsteinsäureanhydrid werden mit 9,5 mmol (1 g) Benzylalkohol werden in 50 ml Toluol gelöst. Nach Zugabe von 1 mmol (190 mg)
35 p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat wird für zwei Stunden unter Rückfluß erhitzt. Im letzten Schritt werden 2 mmol (0,42 g) Benzyl-geschützte Succinat an 1,6 mmol (1,13g) DG-Hist über eine Amidbindung gekoppelt. Die Reaktion erfolgt unter Zugabe

von 2,5 mmol (0,39 g) EDC und 2,5 mmol (0,3 g) DMAP in 50 ml Dichlormethan durch vierstündiges Röhren bei Raumtemperatur. Abschließend erfolgt die Entschützung des Succinats durch Abspaltung des Benzylrestes durch katalytische Hydrogenolyse an 10 % Palladium/Kohlenstoff durch Röhren über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre. Nach Einengen des Reaktionsansatzes im Vakuum erfolgt die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel 60. Als Laufmittel wird Chloroform / Methanol / Ammoniak (25%ige Lösung) 60:40:2 verwandt.

10

Beispiel 3

Synthese von Verbindung #8

(N,N-Bis(propansäure-3-yl)-N-(2,3-dioleoyloxy-propyl)amin

15 Die Synthese der gewünschten Verbindung verläuft über drei Stufen.

In der 1. Stufe wird die Aminogruppe des 3-Amino-1,2-propandiols mit tert-Butylacrylat geschützt. 111 mmol (10 g) 3-Amino-1,2-propandiol werden in 100 ml Acetonitril vorgelegt.

20 Unter Schutzgas werden 222 mmol (28,5 g) tert.-Butylacrylat zugegeben und der Ansatz für zwei Tage unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionsmischung wird am Rotationsverdampfer eingeengt und an Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt. Als Laufmittel wurde Essigester / Methanol 9:1 verwandt.

25 Im nächsten Schritt werden 17,7 mmol (6,15 g) Zwischenprodukt Stufe 1 mit 35,4 mmol (10 g) Ölsäure in 100 ml Dichlormethan vorgelegt. Die Reaktion wird unter Schutzgas und Eisbad-Kühlung durchgeführt. Nach Zugabe von 35,4 mmol (7,3 g) Dicyclohexylcarbodiimid wird die Eiskühlung entfernt und der

30 Ansatz einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Produkt wird roh weiterverwandt. Abschließend wird die Schutzgruppe abgespalten. Dazu werden 11,5 mmol Zwischenprodukt Stufe 2 in

35 25 ml Dichlormethan vorgelegt. Unter Eiswasserkühlung werden langsam 25 ml Trifluoressigsäure zugegeben. Es wird für einen Tag bei 40 °C gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Als Lösungsmittel wird Essigester / Petrolether 1:1 verwandt. Das gewonnene Öl wird in circa 50 ml Aceton aufgenommen und mit 1 N Natriumhydrogencarbonatlösung leicht basisch eingestellt. Nach Zentrifugation wird die überstehende Lösung 5 verworfen. Der Rückstand wird mit wenig Aceton im Utrasschallbad behandelt, zentrifugiert und die überstehende Lösung wird verworfen. Der Rückstand wird in 30 ml Chloroform aufgenommen und mit 30 ml Wasser überschichtet. Unter kräftigem Rühren wird mit 1 N HCl auf pH 5 eingestellt. Die 10 organische Phase wird abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt.

15

Beispiel 4

Herstellung von amphoteren Liposomen

20

2 mg des entsprechenden Lipids und 10 mg DMPC werden in 4 mL Chloroform/ Methanol (1:1, v/v) gelöst und im Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit 4.3 mL eines Puffers (10 mM Kac, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5) in einer Lipidkonzentration von 5 mM durch 5 min Ultraschallbehandlung hydratisiert. Abschließend wird die Suspension eingefroren und nach dem Auftauen mehrfach extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonatfilter 200nm Porenweite). Der Verlauf des Zetapotentials in mV bei 25 verschiedenen pH-Werten ist in Abbildung 1 dargestellt. Der Nulldurchgang zeigt den pH-wert, bei dem das Liposom entladen ist. Dieser pH entspricht dem isoelektrischen Punkt des Lipids 30 und ist für #8 4,5; #34 5,2; #25 5,7;

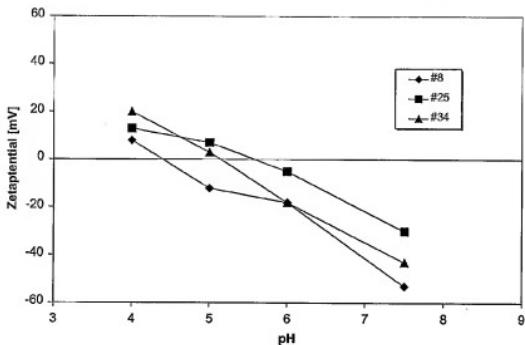


Abbildung 1

5

Beispiel 5

In situ- Synthese von Verbindung #25 (Phosphatidylglyceryl-Carnosin)

10

Unilamellare Liposomen (DPPC / DPPG / Cholesterin 40:20:40 Mol%) werden in einer Konzentration von 20mM Lipid in einem Borat-Puffern (20mM Natriumborat, 120 mM Natriumchlorid pH8,4) suspendiert. Zu 2ml dieser Lösung werden 400 μ l einer 0,6M

15

Natriumperiodatlösung zugegeben, die Mischung wird für 30min im Dunkeln inkubiert. 1ml einer solchen Suspension wird an Sephadex G25 im oben verwendeten Boratpuffer chromatografiert. Das Eluat der Liposomensuspension wird auf 4ml aufgefüllt.

20

Zu den so oxidierten Liposomen wird Carnosin in einer Endkonzentration von 20mM zugegeben und 2 Stunden inkubiert. Abschliessend wurde mit 20mM Natriumborhydrid über Nacht bei 4°C reduziert. Überschüssiges Carnosin kann durch Chromatografie an Sephadex G25 wie oben abgetrennt werden.

25

Beispiel 6**Messung der Serumaggregation von Liposomen**

Zu 140 μ L Humanserum werden 10 μ l einer 25mM Liposomensuspension 5 pipettiert und gut gemischt. Davon werden 65 μ L abgenommen und mit 1,5 mL Puffer (HEPES 10mM, NaCl 150mM pH 7,5) verdünnt. Der Rest wird für 2 h bei 37°C inkubiert und wieder werden 65 μ L abgenommen und mit 1,5 mL Puffer verdünnt. Von beiden Proben werden die Partikelgrößen mit einem Malvern Zetasizer 10 3000 bestimmt. Parallel dazu werden Kontrollproben nur in Puffer aufgenommen, die ebenfalls 2 h bei 37°C inkubiert wurden. Eine unveränderte Partikelgröße zeigt eine gute Serumverträglichkeit an.

15 Beispiel 7**Herstellung von mit DNA-Plasmiden beladenen amphoteren Liposomen**

1,43 mM des amphoteren Lipids werden je nach 20 Lipidzusammensetzung des Lipidfilmes mit den anderen Lipiden in Chloroform gelöst. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der Lipidfilm über Nacht im Vakuum getrocknet. Der Lipidfilm wird direkt mit 1 ml DNA-haltigen (100 μ g DNA / mL) NaAc-Puffer (10 mM NaAc, 150 mM NaCl, pH 4) hydratisiert 25 (leichter Ultraschall, anschließend für 30 min oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur rotiert). Anschließend erfolgt ein freeze/thaw-Schritt.

Die Mischung wird 10 °C oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur 15fach durch 400 nm-Membranen extrudiert.

30 Nicht eingeschlossenen DNA kann durch Flotation im Sucrose-Gradienten (bei pH 7.5) abgetrennt werden (0,8 M Sucrose, 0,5 M Sucrose, Puffer).

Der Gehalt an DNA wird mit Hilfe des Interkalationsfarbstoffes Propidiumiodid durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 35 Interkalation in die DNA bestimmt. Dazu werden 20 μ l Propidiumiodid, 6 μ l Triton X-100 (10 % in Wasser) mit Probe auf 300 μ l aufgefüllt und mit einem Fluoreszenzplattenreader vermessen.

Ansprüche

1. Amphoteres Lipid mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 und 8,5 nach der allgemeinen Formel (I):

(I) **Amphoter - Y - Spacer - Amphiphil**

5 dadurch gekennzeichnet, dass

(a) der **Amphotter** mindestens einen kationischen Ladungsteil mit einem pKa-Wert zwischen 4 bis 8 und/oder mindestens einen anionischen Ladungsteil mit einem pKa-Wert zwischen 3 bis 7 und gegebenenfalls weitere Ladungsträger umfasst, wobei

10 aa) der kationische Ladungsteil ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Imidazol, Morpholin, Piperazin, Purin, Pyridin und/oder Pyrimidin oder ein Derivat hiervon,

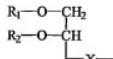
15 bb) der anionische Ladungsteil eine Carboxylgruppe ist, die in der aliphatischen Kette gebundene Essigsäure, Bromessigsäure, Chloressigsäure, Acetoessigsäure, Propionsäure, Acrylsäure, Buttersäure, Crotonsäure oder Carbonsäuren umfasst, die einfach veresterte oder amidierte oder in der aliphatischen Kette gebundene Dicarbonsäure umfasst; die einfach veresterte oder amidierte oder im aliphatischen Teil gebundene Oligocarbonsäure umfasst,

20 25 (b) der **Spacer** ein Niederalkylrest mit bis zu 8 C-Atomen mit linearer, verzweigter oder ringförmiger Struktur mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen und 0-4 Hydroxylgruppen ist,

30 (c) Y - (C=O) -O- ; - (C=O) -NH- ; - NH- (C=O) -O- ; - O- ; - NH- ; - CH=N- ; - O- (O=C) - ; - S- ; - (O=C) - ; - NH- (O=C) - ; - O- (O=C) -NH- , - N=CH- und/oder -S-S- umfasst.

(d) das Amphiphil eine Struktur nach der allgemeinen Formel (II) oder (III) oder (IV) ist:

(II)



5

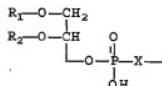
wobei

R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Alkyl oder Acylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und

10 X ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend -O-(C=O); -NH-(C=O)-; -S-(C=O)-; -O-; -NH-; -S-; -N=CH-; -(O=C)-O-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -N=CH- und/oder -S-S-;

oder

(III)



15

wobei

20 R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Acylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und

X -O- ist.

oder

(IV)



25

wobei

R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Alkylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und

5 X abwesend oder ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus - (C=O) -O-; - (C=O) -NH-; - (C=O) -S-; - NH-; - CH=N-; und/oder - S-(O=C) -;

10 10 (e) das Amphiphil eine mit linearen C8 bis C30-Alkoholen-veresterten 1,4- oder 1,5-Dicarbonsäuren wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Citronensäure, Aconitsäure, Citraconsäure und/oder Maleinsäure ist und/oder

15 (f) das Amphiphil eine mit linearen C8 bis C30-Fettsäuren amidierten 1,4- oder 1,5-Diaminen des 3-Aminoalanins, Diaminobuttersäure, Ornithins oder Lysin ist.

2. Lipid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

dass die Dicarbonsäure ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Oxalsäure, Malonsäure, Bernseinsäure, 20 Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Caprylsäure, Pimelinsäure, Suberinsäure, Cyclohexanedicarbonsäure und / oder Cyclopentandicarbonsäure und / oder die Oligocarbonsäure ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Citronensäure, 25 Isocitronensäure und / oder Ethylendiamintetraessigsäure.

3. Lipid nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet, dass

30 das amphotere Lipid einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 aufweist.

4. Lipid nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet, dass

sich die pKa-Werte des kationischen und anionischen Ladungsteils des Amphoters sich höchstens um 2 pH-Einheiten unterscheiden.

5. Lipid nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

dadurch gekennzeichnet, dass

10 das kationische Ladungsteil des Amphoters Imidazol, Piperazin, Morphinol, der anionische Ladungsteil die Carboxylgruppe umfasst.

6. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 5,

15 dadurch gekennzeichnet, dass

das Amphotter ein Peptid mit 2-6 Aminosäuren ist, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Histidin, Arginin, Lysin, Glutaminsäure und/oder Asparaginsäure,

wobei

20 i) der prozentuale Anteil von His und Asp/Glu 66% nicht überschreitet oder

ii) der prozentuale Anteil von Arg/Lys kleiner 50%, der von Asp/Glu größer als 50% ist, oder

25 iii) der prozentuale Anteil von His und Arg/Lys kleiner/gleich 33%, der von Asp/Glu größer als Arg/Lys ist.

7. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 6,

dadurch gekennzeichnet, dass

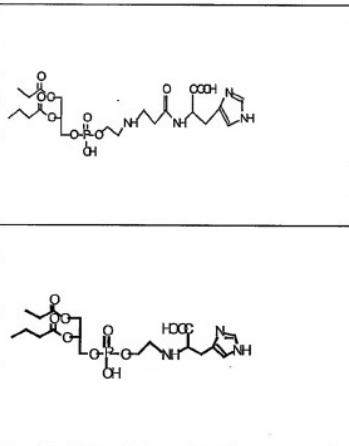
das Amphiphil ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
5 Diacylglycerolen, Dialkylglycerolen, Phosphoglycerolen,
acylierte oder alkylierte 3-Amino-1,2-Propandiolen und/oder
N,N-Dialkylaminen.

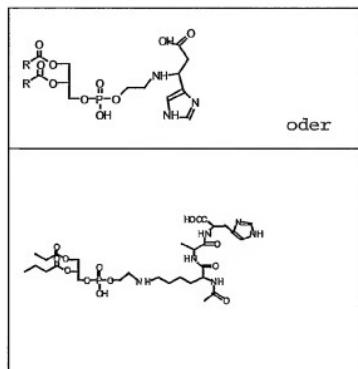
8. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 7,

dadurch gekennzeichnet, dass

10 der Spacer Zucker oder ein Polyethylenglykol mit bis zu 20
Monomereinheiten umfasst.

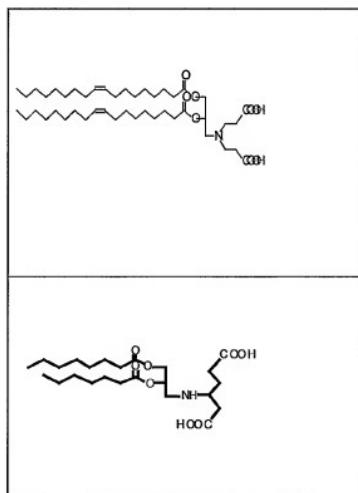
9. Amphoteres Lipid mit der Struktur

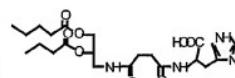
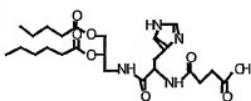




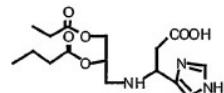
wobei die langkettigen Amphiphile unabhängig voneinander Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleoyl- und Linoyl-Reste umfassen.

5 10. Amphoteres Lipid mit der Struktur





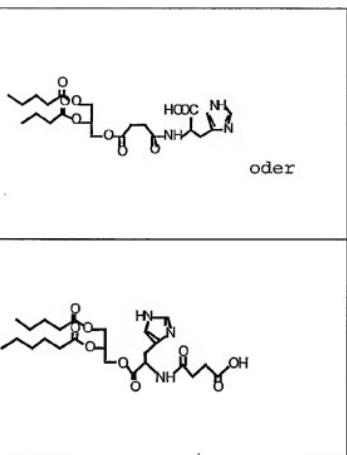
oder



wobei die langkettigen Amphiphile unabhängig voneinander

- a) Lauretyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleoyl- oder Linoyl-Reste oder
- b) Lauretyl-, Myristyl-, Palmityl-, Stearyl-, Oleyl- oder Linyl-Reste umfassen.

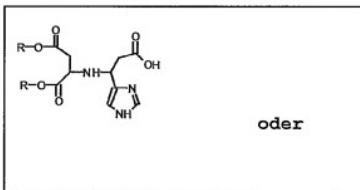
11. Amphoteres Lipid mit der Struktur

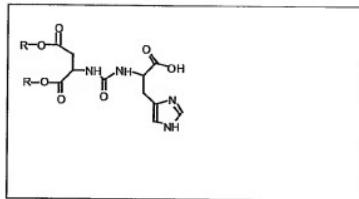


wobei die langkettigen Amphiphile unabhängig voneinander

- a) Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleoyl- oder Linoyl-Reste oder
- 5 b) Lauryl-, Myristyl-, Palmityl-, Stearyl-, Oleyl- oder Linyl-Reste umfassen.

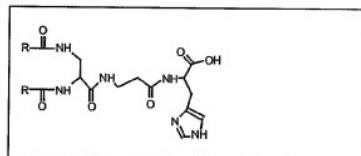
12. Amphoteres Lipid mit der Struktur





wobei die langkettigen Amphiphile unabhängig voneinander Lauryl-, Myristyl-, Palmityl-, Stearyl-, Oleyl- oder Linyl-Reste umfassen.

5 13. Amphoteres Lipid mit der Struktur



wobei die langkettigen Amphiphile Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleoyl- oder Linoyl-Reste umfassen

10 14. Liposomen umfassend amphotere Lipide nach einem der Ansprüche 1 bis 13.

15 15. Liposomen nach dem vorhergehenden Ansprüchen 1 bis 14,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Liposomen maximal 50 mol% des amphoteren Lipids umfassen, bevorzugt 2 bis 50 mol%, besonders bevorzugt 10 bis 40 mol%.

16. Liposomen nach Anspruch 14 oder 15,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Liposomen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin,
Diacylglycerol, Tetraetherlipid und/oder PEG-Lipid
umfassen.

5

17. Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 16,

dadurch gekennzeichnet, das

die Liposomen eine mittlere Größe zwischen 50 und 1000 nm,
10 bevorzugt zwischen 50 und 300 nm, besonders bevorzugt
zwischen 60 und 130 nm aufweisen.

10

18. Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 17,

dadurch gekennzeichnet, dass

15 die Liposomen einen Wirkstoff umfassen.

15

19. Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 18,

dadurch gekennzeichnet, dass

der Wirkstoff ein Protein, ein Peptid, eine DNA, eine RNA,
20 ein antisense-Nukleotid und/oder ein Decoy-Nukleotid ist.

20

20. Liposomen nach dem Anspruch 18 oder 19,

dadurch gekennzeichnet, dass

mindestens 50 µg, bevorzugt mehr als 90µg, besonders
25 bevorzugt mehr als 150µg des Wirkstoffes pro mg Lipid im
Innern des Liposoms eingeschlossen sind.

21. Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 20,

dadurch gekennzeichnet, dass

5 ein Bindungs-pH-Wert zur Verkapselung eines Wirkstoffs eingesetzt wird und ein zweiter pH-Wert zur Abtrennung der nicht gebundenen Wirkstoffe verwendet wird.

22. Liposomen, hergestellt nach dem Verfahren von Anspruch 21.

10 23. Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 20,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Liposomen bei einem bestimmten pH-Wert permeabilisiert und folgend verschlossen werden.

15

24. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 20 zur Herstellung von Nanokapseln.

20 25. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 20 zur Herstellung von Freisetzungssystemen in der Diagnostik.

26. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 20 zum Transport und zur Freisetzung von Wirkstoffen.

25 27. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 20 als Depotformulierung und/oder als zirkulierbares Depot.

28. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 20 als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro und/oder ex vivo.

5

29. In-vivo-Transfektionssystem,

dadurch gekennzeichnet, dass

es mit genetischem Material beladene Liposomen nach Anspruch 14 bis 20 enthält.

10

30. In-vivo-Transfektionssystem,

dadurch gekennzeichnet, dass

es mit genetischem Material beladene Liposomen mit amphoteren Lipiden, nach der Formel

15

(I) **Amphoteric - Y - Spacer - Amphiphil**

dadurch gekennzeichnet, dass

(a) der **Amphoteric** mindestens einen kationischen Ladungsteil mit einem pKa-Wert zwischen 4 bis 8 und/oder mindestens einen anionischen Ladungsteil mit einem pKa-Wert zwischen 3 bis 7 und gegebenenfalls weitere Ladungsträger umfasst, wobei

20

aa) der kationische Ladungsteil ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Imidazol, Morphinol, Piperazin, Purin, Pyridin und/oder Pyrimidin oder ein Derivat hiervon,

25

bb) der anionische Ladungsteil eine Carboxylgruppe ist, die in der aliphatischen Kette gebundene Essigsäure, Bromessigsäure, Chloressigsäure,

Acetoessigsäure, Propionsäure, Acrylsäure,
 Buttersäure, Crotonsäure oder Carbonsäure
 umfasst, die einfach veresterte oder amidierte
 oder in der aliphatischen Kette gebundene
 Dicarbonsäure wie Oxalsäure, Malonsäure,
 Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure,
 Äpfelsäure, Weinsäure, Glutarsäure,
 Adipinsäure, Caprylsäure, Pimelinsäure,
 Suberinsäure, Cyclohexanddicarbonsäure oder auch
 Cyclopentanddicarbonsäure umfasst; die einfach
 veresterte oder amidierte oder im aliphatischen
 Teil gebundene Oligocarbonsäure wie
 Citronensäure, Isocitronensäure oder
 Ethyldiamintetraessigsäure umfasst,

(b) der **Spacer** ein Niederalkylrest mit bis zu 8 C-
 Atomen mit linearer, verzweigter oder ringförmiger
 Struktur mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten
 Bindungen und 0-4 Hydroxylgruppen ist,

(c) Y - (C=O) -O-; - (C=O) -NH-; - NH- (C=O) -O-; - O-; - NH-;
 -CH=N-; -O- (O=C) -; -S-; (O=C) -; -NH- (O=C) -; -O-
 (O=C) -NH-, -N=CH- und/oder -S-S- umfasst,

(d) das Amphiphil eine Struktur nach der Formel (V)
 ist:

(V)



wobei

R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Alkyl mit
 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind
 und

X ausgewählt ist aus der Gruppe -O-; -NH-; -S-.

31. In-vivo-Transfektionssystem nach Anspruch 30,

dadurch gekennzeichnet, dass

das Amphiphil eine Struktur nach der Formel (VI) ist:

5 (VI)



wobei

10 R C8 bis C30 Alkyl mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen ist und

X ausgewählt ist aus der Gruppe -O-; -NH-; -S-.

32. Verwendung des In-vivo-Transfektionssystems nach Anspruch 29 als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro
15 und/oder ex vivo.

33. Verwendung des In-vivo-Transfektionssystems nach einem der Ansprüche 30 bis 31 als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro und/oder ex vivo.

20

34. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 14 bis 20 bei intravenöser und/oder peritonealer Applikation.

(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. August 2003 (28.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2003/070735 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation?: **C07F 9/6506**, C07K 5/062, 5/078, 5/09, C07C 229/16, C07D 233/64, A61K 9/127, C12N 15/88
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/001662
- (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 2003 (19.02.2003)
- (25) Einrichtungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 102 07 178.0 19. Februar 2002 (19.02.2002) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): NOVOSOM AG [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ESSLER, Frank [DE/DE]; August-Bebel-Straße 41, 06108 Halle (DE), PANZNER, Steffen [DE/DE]; Blumenstrasse 9, 06108 Halle (DE). ENDERT, Gerold [DE/DE]; Seebener Strasse 20, 06114 Halle (DE).
- (74) Anwälte: SCHNEIDER, Henry usw.; Gukle Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schlüterstrasse 15-17, 10117 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AI, AU, BA, BB, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, RO, SC, SG, SN, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfinderverklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 25. März 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

A3

WO 2003/070735

(54) Title: COMPONENTS FOR PRODUCING AMPHOTERIC LIPOSOMES

(54) Bezeichnung: KOMPONENTEN FÜR DIE HERSTELLUNG AMPHOTERER LIPOSOMEN

(57) Abstract: The invention relates to amphoteric lipids. According to the invention, at least one amphoteric group having an isoelectric point between 4 and 9 is substituted on a membranous or membrane-forming amphiphile. The invention also relates to liposomes containing said compounds.

(57) Zusammenfassung: Es werden amphotere Lipide vorgeschlagen, wobei an ein membranständiges oder membranbildendes Amphiphil eine oder mehrere amphotere Gruppen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 9 substituiert sind sowie Liposomen, die diese Verbindungen enthalten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

B1

International Application No.

PCT/EP 03/01662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07F9/6506 C07K5/062 C07K5/078 C07K5/09 C07C229/16 C07D233/64 A61K9/127 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07F C07K C07C C07D A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEYES J A ET AL: "Synthesis of novel cationic lipids: Effect of structural modification on the efficiency of gene transfer" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 45, no. 1, 3 January 2002 (2002-01-03), pages 99-114, XP002219198 ISSN: 0022-2623 the whole document ---	1,14
X	EP 0 169 812 A (CIBA-GEIGY AG) 29 January 1986 (1986-01-29) the whole document ---	1 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim for a special reason (as specified)
- *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *R* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

V document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art,

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

14 October 2003

22/10/2003

Name and mailing address of the ISA

Authorized officer

European Patent Office, P.B. 5618 Patentkant 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-9016

Beslier, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

B1

International Application No.
PCT/EP 03/01662

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 58849 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document -----	1
A	US 6 090 800 A (EVAN C. UNGER) 18 July 2000 (2000-07-18) the whole document -----	1-34
A	WO 00 59474 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 12 October 2000 (2000-10-12) cited in the application the whole document -----	1-34
A	WO 95 35301 A (MEGABIOS CORPORATION) 28 December 1995 (1995-12-28) the whole document -----	1-34
P, X	WO 02 072068 A (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LTD.) 19 September 2002 (2002-09-19) the whole document -----	1,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

B1

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/01662

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 169812	A	29-01-1986		AT 45744 T AU 582772 B2 AU 4537885 A DD 247680 A5 DE 3572491 D1 DK 337485 A EP 0169812 A1 ES 8701186 A1 FI 852841 A ,B, GR 851825 A1 HU 38360-A2, IL 75886 A JP 61043193 A NO 852953 A NZ 212860 A PT 80851 A ,B US 4788182 A ZA 8505580 A		15-09-1989 13-04-1989 30-01-1986 15-07-1987 28-09-1989 26-01-1986 29-01-1986 16-02-1987 26-01-1986 26-11-1985 28-05-1986 31-10-1989 01-03-1986 27-01-1986 27-03-1990 01-08-1985 29-11-1988 26-03-1986
WO 0158849	A	16-08-2001	ES	1045340 U1	16-08-2000	
			WO	0158849 A1	16-08-2001	
US 6090800	A	18-07-2000	AU	6185398 A AU 6971998 A AU 6974798 A EP 1037673 A1 US 2003054027 A1 US 2002159951 A1 WO 9842383 A1 WO 9850040 A1 WO 9850041 A1 US 6444660 B1 US 6403056 B1 US 6028066 A US 6120751 A	20-10-1998 27-11-1998 27-11-1998 27-09-2000 20-03-2003 31-10-2002 01-10-1998 12-11-1998 12-11-1998 03-09-2002 11-06-2002 22-02-2000 19-09-2000	
WO 0059474	A	12-10-2000	US	6379698 B1	30-04-2002	
			AU	4221400 A	23-10-2000	
			EP	1165047 A1	02-01-2002	
			JP	2002541089 T	03-12-2002	
			WO	0059474 A1	12-10-2000	
			US	2003082154 A1	01-05-2003	
WO 9535301	A	28-12-1995	WO	9535301 A1	28-12-1995	
			AU	696881 B2	24-09-1998	
			AU	7471194 A	15-01-1996	
			CA	2194221 A1	28-12-1995	
			EP	0807116 A1	19-11-1997	
			JP	10506093 T	16-06-1998	
			NO	970172 A	15-01-1997	
			NZ	271165 A	28-10-1998	
WO 02072068	A	19-09-2002	WO	02072068 A2	19-09-2002	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen
PCT/EP 03/01662

A. KLASSEIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 7	C07F9/6506	C07K5/062	C07K5/078	C07K5/09	C07C229/16
	C07D233/64	A61K9/127	C12N15/88		

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiert Mindestpräzisat (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07F C07K C07C C07D A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisat gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationale Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>HEYES J A ET AL: "Synthesis of novel cationic lipids: Effect of structural modification on the efficiency of gene transfer" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, Bd. 45, Nr. 1, 3. Januar 2002 (2002-01-03), Seiten 99-114, XP002219198 ISSN: 0022-2623 das ganze Dokument</p> <p>EP 0 169 812 A (CIBA-GEIGY AG) 29. Januar 1986 (1986-01-29) das ganze Dokument</p>	1, 14
X		1 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patenfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"V" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, also kein besonderes Interesse daran besteht, ob sie veröffentlicht ist

"B" Berichts-Dokument, das jedoch entweder aus oder nach dem Internationalen Anmeldeamt veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die gleichzeitig mit einem Prioritätsanspruch zweifachheit erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll, wie aus einem anderen besondern Grund angegeben ist (wie ausführlicher)

"C" Veröffentlichung, die sich auf eine mindreiche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldeamt, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Später Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipps oder der ihr zugrundeliegenden Technik angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beispielhafte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"V" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beispielhafte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung in einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen derselben Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patenfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des Internationalen Rechercheberichts

14. Oktober 2003

22/10/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde

Befvoiglichtiger Bediensteter

Europäisches Patentamt, P.B. 5616 Patentamt 2
 NL - 2280 HV Haarwijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 opo nl
 Fax: (+31-70) 340-3016

Beslier, L

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

B1

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/01662

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 58849 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16. August 2001 (2001-08-16) das ganze Dokument -----	1
A	US 6 090 800 A (EVAN C. UNGER) 18. Juli 2000 (2000-07-18) das ganze Dokument -----	1-34
A	WO 00 59474-A (ISIS-PHARMACEUTICALS, INC.) 12. Oktober 2000 (2000-10-12) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-34
A	WO 95 35301 A (MEGABIOS CORPORATION) 28. Dezember 1995 (1995-12-28) das ganze Dokument -----	1-34
P, X	WO 02 072068 A (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LTD.) 19. September 2002 (2002-09-19) das ganze Dokument -----	1,14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen:

PCT/EP 03/01662

B1

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 169812	A	29-01-1986		AT 45744 T		15-09-1989
				AU 582772 B2		13-04-1989
				AU 4537885 A		30-01-1986
				DD 247680 A5		15-07-1987
				DE 3572491 D1		28-09-1989
				DK 337485 A		26-01-1986
				EP 0169812 A1		29-01-1986
				ES 8701186 A1		16-02-1987
				FI 852841 A , B		26-01-1986
				GR 851825 A1		26-11-1985
				HU 38360 A2		28-05-1986
				IL 75886 A		31-10-1989
				JP 61043193 A		01-03-1986
				NO 852953 A		27-01-1986
				NZ 212860 A		27-03-1990
				PT 80851 A , B		01-08-1985
				US 4788182 A		29-11-1988
				ZA 8505580 A		26-03-1986

WO 0158849	A	16-08-2001		ES 1045340 U1		16-08-2000
				WO 0158849 A1		16-08-2001

US 6090800	A	18-07-2000		AU 6185398 A		20-10-1998
				AU 6971998 A		27-11-1998
				AU 6974798 A		27-11-1998
				EP 1037673 A1		27-09-2000
				US 2003054027 A1		20-03-2003
				US 2002159951 A1		31-10-2002
				WO 9842383 A1		01-10-1998
				WO 9850040 A1		12-11-1998
				WO 9850041 A1		12-11-1998
				US 6444660 B1		03-09-2002
				US 6403056 B1		11-06-2002
				US 6028066 A		22-02-2000
				US 6120751 A		19-09-2000

WO 0059474	A	12-10-2000		US 6379698 B1		30-04-2002
				AU 4221400 A		23-10-2000
				EP 1165047 A1		02-01-2002
				JP 2002541089 T		03-12-2002
				WO 0059474 A1		12-10-2000
				US 2003082154 A1		01-05-2003

WO 9535301	A	28-12-1995		WO 9535301 A1		28-12-1995
				AU 696881 B2		24-09-1998
				AU 7471194 A		15-01-1996
				CA 2194221 A1		28-12-1995
				EP 0807116 A1		19-11-1997
				JP 10506093 T		16-06-1998
				NO 970172 A		15-01-1997
				NZ 271165 A		28-10-1998

WO 02072068	A	19-09-2002		WO 02072068 A2		19-09-2002